



Rec'd PCT/PTO

PCT/JP 03/02744

10 SEP 2004

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

07.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月11日

REC'D 05 MAY 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-065298

[ST.10/C]:

[JP2002-065298]

出願人

Applicant(s):

株式会社先端科学技術インキュベーションセンター

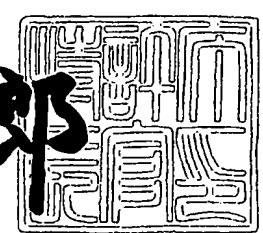
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月15日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3026517

【書類名】 特許願

【整理番号】 200203032

【提出日】 平成14年 3月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都中野区上鷺宮 5 - 1 7 - 2 2

    【氏名】 片岡 一則

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県北相馬郡守谷町けやき台 3 - 5 - 1 7

    【氏名】 長崎 幸夫

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区井田中ノ町 1 1 - 1 3

    【氏名】 大塚 英典

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県柏市柏 2 - 5 - 7 - 3 0 1

    【氏名】 内田 勝美

【特許出願人】

    【識別番号】 500213982

    【氏名又は名称】 片岡 一則

【代理人】

    【識別番号】 100060782

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】

    【識別番号】 100094293

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 藤井 幸喜

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019666

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

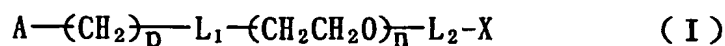
【書類名】 明細書

【発明の名称】 増大した密度のポリ（エチレンオキシド）のブラシ様構造表面

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 一般式

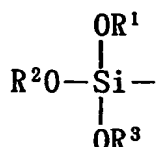
【化1】



[式中、

AはHS-または

【化2】



基を表し、ここで、

$R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ は独立して $C_1 \sim C_6$ アルキル基を表し、

$L_1$ は第一の連結基または原子価結合を表し、

$L_2$ は第二の連結基または原子価結合を表し、

Xは水素原子、官能基、保護された官能基またはリガンドを表し、

pは2～12の整数であり、

nは10～1,000の整数である]で表されるポリマーの1種または2種以上を、それらのA部を介して結合したバイオセンサー表面であって、

(b) ポリマーのそれぞれを、一般式(I)におけるAがHS-であり、そして $-L_2-X$ が $-CH_2CH_2CH(OCH_2CH_3)_2$ であるポリマーに相当するポリマーとして、表面プラズモン共鳴(SPR)検出器の金薄膜製の検出チップ上に結合させ、SPR検出器により該表面上へのウシ血清アルブミンの吸着の程度を測定した場合の $\Delta\theta \times 10^{-4} [^\circ]$ 値が10以下を示す、ことを特徴とする表面。

【請求項2】  $\Delta\theta \times 10^{-4} [^\circ]$ 値が5以下を示す請求項1記載の表面。

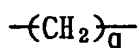
【請求項3】 一般式(I)におけるAがHS基であり、 $L_1$ が

【化3】



(酸素原子を介してエチレンオキシド単位に結合する。)、 $-\text{O}-$ または $-\text{S}-$ であり、 $\text{L}_2$ が原子価結合または

【化4】



(ここで、 $q$ は2～6の整数である)であり、そして $\text{X}$ が水素原子、

【化5】



または $-\text{COOH}$ であり、 $\text{R}^b$ は独立して水素原子または $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルを表し、 $\text{R}^c$ は独立して $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルオキシまたは2つの $\text{R}^c$ が一緒になってオキシもしくは $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルで置換されていてもよいエチレン基を形成する、請求項1記載の表面。

【請求項4】 一般式(I)における $\text{A}$ が $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-$ 基であり、 $\text{L}_1$ が $-\text{O}-$ 、 $-\text{NHCOO}-$ (酸素原子を介してエチレンオキシド単位に結合する。)または $-\text{N}(\text{R}^d)-$ ( $\text{R}^d$ は $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルである)であり、 $\text{L}_2$ が原子価結合、 $-(\text{CH}_2)_\gamma-$ または $-\text{CO}(\text{CH}_2)_\gamma-$ (ここで、 $\gamma$ は2～6の整数である)であり、そして $\text{X}$ が水素原子、

【化6】



または $-\text{COOH}$ であり、 $\text{R}^b$ は独立して水素原子または $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルオキシを表し、 $\text{R}^c$ は独立して $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルオキシまたは2つの $\text{R}^c$ が一緒になっ

てオキシもしくは $C_1 \sim C_6$ アルキルで置換されていてもよいエチレン基を形成する、請求項1に記載の表面。

【請求項5】 表面の支持体が金、銀、銅およびアルミニウムからなる群から選ばれる材料で作製されている請求項2記載の表面。

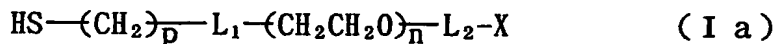
【請求項6】 表面の支持体がガラス、半導体、セラミック、金属酸化物および合金酸化物よりなる群から選ばれる材料で作製されている請求項4記載の表面。

【請求項7】 一般式(I)における $n$ が10～60のいずれかの整数であるポリマーと $n$ が50～1000のいずれかの整数であるポリマーとの2種以上のポリマーが組み合わさった請求項1～6のいずれかに記載の表面。

【請求項8】 表面がSPR検出器の検出チップ上に形成されたものである請求項1、2、3、5および7のいずれかに記載の表面。

【請求項9】 (A) 一般式(Ia)

【化7】



(式中、 $L_1$ 、 $L_2$ 、 $X$ 、 $p$ および $n$ は請求項1における一般式(I)について定義したのと同義である)

で表されるポリマーの水性溶液を金、銀、銅およびアルミニウムよりなる群から選ばれる金属表面と該ポリマーの所定量が該金属表面に結合するのに十分な条件下で接触させた後、未結合ポリマーを洗浄除去する工程、

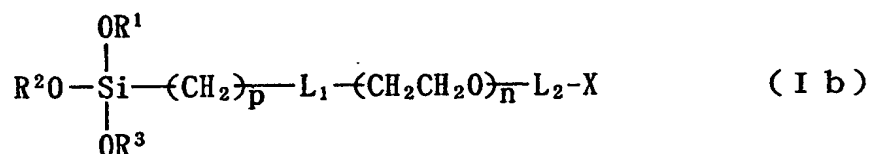
(B) 次いで、前記工程で結合させたポリマーと同一のポリマーまたは異なるポリマーであって、 $n$ 数(すなわち、エチレンオキシド単位の数)が小さいポリマーの水性溶液を、(A)工程でもたらされた金属表面と、該表面に結合するのに十分な条件下で接触させた後、未結合ポリマーを洗浄除去する工程、ならびに

(C) こうして得られる表面に(B)工程と同様な複数の工程を行うこと、を含んでなる請求項1に記載の表面のうち、一般式(I)のAがHS-である表面の作製方法。

【請求項10】 (B) 工程以降が (A) 工程と異なるポリマーを用いて行われ、(A) 工程では、一般式 (I) における  $n$  が 50～1000 のいずれかであるポリマーが使用され、(B) 工程以降では一般式 (I) における  $n$  が 10～60 のいずれかであるポリマーが使用される請求項9記載の方法。

【請求項11】 (A) 一般式 (I b)

【化8】



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ 、 $\text{X}$ 、 $p$ および $n$ は請求項1における一般式 (I) について定義したのと同様である)

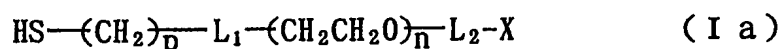
で表されるポリマーの有機溶媒溶液をガラス、半導体、セラミックス、金属酸化物および合金酸化物よりなる群から選ばれる材料と該ポリマーの所定量が該材料表面に付着または結合するのに十分な条件下で接触させた後、溶媒を留去し、そして未結合ポリマーを洗浄除去する工程、

(B) 次いで、前記工程で結合させたポリマーと同一のポリマーまたは異なるポリマーであって、 $n$ 数(すなわち、エチレンオキシド単位の数)が小さいポリマーの有機溶媒溶液を、(A) 工程でもたらされた材料表面と該表面に付着または結合するのに十分な条件下で接触させた後、溶媒を留去し、そして未結合ポリマーを洗浄除去する工程、ならびに

(C) こうして得られる表面に (B) 工程と同様な複数の工程を行うこと、を含んでなる請求項1に記載の表面のうち、一般式 (I) のAがトリアルコキシシリル基である表面の作製方法。

【請求項12】 (A)' 一般式 (I a)

【化9】



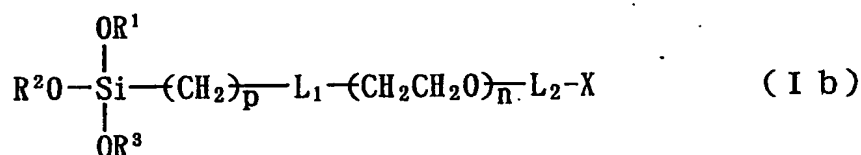
(式中、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ 、 $\text{X}$ 、 $p$ および $n$ は請求項1における一般式 (I) について定

義したのと同義である)

で表されるポリマーであって、 $n$ 数が少なくとも10異なる2種以上のポリマー群の水性溶液を金、銀、銅およびアルミニウムよりなる群から選ばれる金属表面と該ポリマーの所定量が該金属表面に結合するのに十分な条件下で接触させた後、未結合ポリマーを洗浄除去する工程、  
を含んでなる請求項1に記載の表面のうち、一般式(I)のAがHS-である表面の作製方法。

【請求項13】 (A)' 一般式(Ib)

【化10】



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ 、 $\text{X}$ 、 $p$ および $n$ は請求項1における一般式(I)について定義したのと同様である)

で表されるポリマーであって、 $n$ 数が少なくとも10異なる2種以上のポリマー群の有機溶媒溶液をガラス、半導体、セラミックス、金属酸化物および合金酸化物よりなる群から選ばれる材料と該ポリマーの所定量が該材料表面に付着または結合するのに十分な条件下で接触させた後、溶媒を留去し、そして未結合ポリマーを洗浄除去する工程、

を含んでなる請求項1に記載の表面のうち、一般式(I)のAがトリアルコキシシリル基である表面の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、バイオセンサーの分野に関し、より具体的には、生物学的流体等に含まれる被検体以外の夾雑物による非特異吸着もしくは結合を低減もしくは防止するバイオセンサー表面に関する。

【0002】



## 【従来の技術】

生物学的試料中に存在する被検体を検出する方法として、多種多様な検出様式をもつバイオセンサーが提案されている。そのようなバイオセンサーの中で、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用するセンサーは、金属薄膜の表面およびその近傍における屈折率変化に対して敏感である（例えば、A. Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 699-705 参照）。SPRは、表面と複雑な生物学的溶液との間で生じる過程のインサイチュ（in situ）での観察が可能であり、そして例えば標識を使用することなくリアルタイムに被検体からのデータが入手できるので、動力的および熱力学的なパラメーターを取得するのに適していることから注目を集めているセンサーの一つである。

## 【0003】

このような表面をもつバイオセンサーチップの典型的なものとしては、アマシヤム ファルマシア バイオテック（株）から入手できるB I A C O R E（商標）がある。このB I A C O R Eは、末端がカルボキシル化されたデキストランのマトリックスが半透明の状態で金の薄膜上に固定されている。かような検出表面を特許請求すると思われるものとしては特許第2815120号（EP U.S. Patent No. 5,242,828およびEP O 589 867 B1に対応する）公報がある。該公報によれば、H S - R - Y（Rは10原子を越える鎖の長さを有し、ヘテロ原子で中断されていてもよい炭化水素鎖であり、Yはリガンド又は生適合性多孔質マトリックスを共有結合させるための活性基である）で表される有機分子を用いて、そのチオール（またはメルカプト）基を介して金、銀などの自由金属の膜表面へ結合させて密に詰め込まれた単層で該表面を被覆し、次いで、生適合性多孔質マトリックスとして、リガンドを結合させるための官能基を有していてもよいアガロース、デキストラン、ポリエチレングリコール等からなるヒドロゲルを共有結合した表面が記載されている。

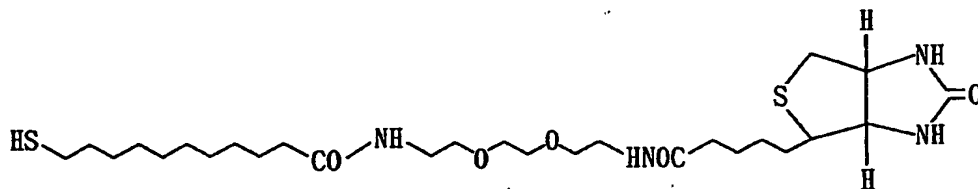
## 【0004】

特許第3071823号（U.S. Patent No. 5763191およびEP O 574 000 B1に対応）には、保持材上へ硫黄原子（メルカプト基の）を介して結合したスペーサー分子（炭素原子数1～30のアルキレン鎖）に

親水性リンカー部（鎖長4から15原子の直鎖分子）と固相反応物質（ビオチン誘導体残基）が順に共有結合した表面が記載されている。そして、かような表面を形成するビオチニル化合物の典型的なものとして、次式で表される化合物が記載されている。

【0005】

【化11】



【0006】

該表面の固相反応物質を有する分子鎖は、さらに固相反応物質（すなわち、上式の例では、ビオチン誘導体残基）を有しないか、または固相反応物質も親水性リンカーも有しない希釈分子によって希釈されていてもよい。

【0007】

Roberts et al., J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 6548-6555 には、HS-スパーサー分子（炭素原子数11のアルキレン鎖）-親水性リンカー（エチレンオキシド単位3個または6個からなる鎖）-をベースとする化合物を用い、メルカプト基を介して金表面に自己集成した単層が記載されている。また、親水性リンカー部がエチレンオキシド単位3個の化合物と、エチレンオキシド単位6個（末端にオリゴペプチドのリガンドが結合している）の化合物との混合物から形成された表面は、細胞のリガンド特異的結合を促進するが、付着した細胞によるタンパク質の堆積を低減することも教示されている。

【0008】

Pavey et al., Biomaterials 20 (1999) 885-890 には、ポリ（エチレンオキシド）<sub>n</sub>-ポリ（プロピレンオキシド）<sub>m</sub>-ポリ（エチレンオキシド）<sub>n</sub> のトリブロックコポリマーの様々な2種の組み合わせ物を、SPRの検出用金属薄膜上に付着させた表面が記載されている。また、こうして形成された表面では、溶液中にポリ（エチレンオキシド）鎖が伸長し、ブラシ様構造物（brush-like

architecture) を形成することが示唆されている。さらに、ポリ(エチレンオキシド)の鎖長(n)が異なる2種のトリブロックコポリマーが付着した表面は、それらの1種が付着した表面より一般的にタンパク質(ウシ血清アルブミン)の吸着が低減することも示されている。

#### 【0009】

ところで、以上の先行技術文献のうち、特許第2815120号には、鎖(R)の長さが10原子を越え、好ましくは12～30原子の例えば、疎水性のかなり大きなアルキレン鎖をもつ16-メルカプトヘキサデカノールをチオール基を介して金属表面に化学吸着させることにより、有機分子が密に詰め込まれた単層の表面が得られることが記載されている。こうして得られる単層は貯蔵安定性があり、しかも、金属表面を化学腐食から保護する有効なバリアー層となりうることも示唆されている。そして、かようなバリアー層上には、タンパク質適合性と非特異的相互作用を最小化するヒドロゲルが結合されている。したがって、該特許発明に関連する好適な態様と思われる上記B I A C O R E (商標)(デキストランのヒドロキシゲルを担持する)は、実用化されている。しかし、バリアー層上にヒドロキシゲルを均一に担持させるのは容易ではなく、厳密な操作が必要であり、また、タンパク質の非特異的吸着は相当に低減しているが、未だ改良の余地がある。

#### 【0010】

特許第3071823号は、上述したビオチニル化合物の形成する表面のビオチニル(固相反応物質)が密である場合には、例えば、ビオチンと非共有結合的結合対を形成する遊離のアビジンとの結合が遅いこと等を改良するために、敢えて、ビオチニル化合物を疎らに保持材料表面へ結合させるか、あるいはビオチニル残基を有していない希釈分子と相当するビオチニル残基を有する分子とを10:1～2:1で用いて希釈分子とビオチニル残基(固相反応物質)を有する分子とを、共に該表面へ結合させている。かような表面また、Roberts et al.の表面は、エチレンオキシド単位約5～6個までの親水性リンカー部を有するが、特許第2815120号のようなヒドロゲル層を有しないので、目的とするタンパク質(例えば、ストレプトアビジン)や細胞以外の夾雑タンパク質の非特異

的吸着が生じうる。

【0011】

Bavey et al., はトリブロックコポリマーの疎水性ブロックであるポリ（プロピレンオキシド）ドメインを介して金属表面へ付着させるものであり、通常のポリマーコーティングと同様に安定性、均一性および再現性ある表面を得ることが困難である（U.S. Patent No. 4415666 参照）。しかも、ポリ（エチレンオキシド）鎖の密度を高めることも困難である。

【0012】

本発明者らの一部は、以上のような先行技術に伴う短所が解消されるか軽減された表面を提供するものとして、片末端にメルカプト（-SH）基を有し、もう一つの末端に保護されていてもよいポリ（エチレンオキシド）（以下、PEGと略記する場合あり）を主体とするポリマーを緩衝液に溶解させた後約1時間SPRのセンサーチップの金表面の接触させたところ、該表面への非特異的なタンパク質の吸着が上記市販のBIAcore（商標）のセンサーチップ表面CM5に対するのと同等以上に低減できることを見出して特許出願した（WO 01/86301 参照）。

【0013】

上述の特許第2815120号によれば、金属表面へ密にHS-R-Y鎖を詰め込むのに、Rが少なくとも10原子の炭化水素基であることが要求されている。他方、特許第3071823号によればビオチニル化合物が、例えば、鎖長4から15原子の親水性リンカー（エチレンオキシド単位で1～3）を有するものを使用することによって、該化合物による鎖が疎な表面を形成している。ところが上記WO 01/86301によれば、驚くべきことに、例えば、PEG部の分子量が1000～10000であるような長鎖のポリマーを有する点で特許第3071823号または Roberts et al. に記載のポリマーとは全く異なる巨大分子がそのメルカプト基を介して水溶液から金属表面に効率よく結合できている。すなわち、WO 01/86301に記載のポリマーでは、溶液中の親水性PEO鎖とタンパク質との空間的な反発作用を介して、表面でのそれらの相互作用を低下させるように水和されたPEO層はフレキシブルであり可動性であると

当業者に認識されているにもかかわらず、所望量（または適度な密度）のPEO鎖が表面に安定に結合されているのである。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、WO 01/86301に記載の表面もBIACORE（商標）のセンサー表面と同様に、可能であれば、夾雑タンパク質の非特異的吸着がさらに低減できることが望まれるであろう。したがって、本発明は、WO 01/86301に記載の表面の、例えば、非特異的吸着において、さらなる低減がなされた表面を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】

理論によって拘束されるものでないが、上述のように溶液中のPEO鎖は可動性で立体的に相互に反発しあうためか、WO 01/86301に記載したような結合方法では、假に、処理時間を延長してもポリマーの結合量を有意増大させることはできなかった。しかしながら、改めて、該結合操作を繰り返した場合に、新たに、追加のポリマーを同一表面に結合できることを見出した。しかも、こうして得られる表面は、WO 01/86301に記載された表面に比し、夾雑タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン（以下、BSAという））の吸着が有意に低減できることが確認できた。

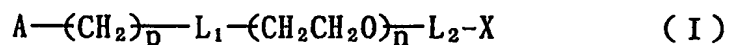
【0016】

したがって、本発明によれば、

(a) 一般式

【0017】

【化12】



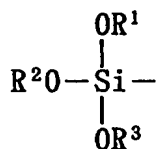
【0018】

[式中、

AはHS-または

【0019】

【化13】



【0020】

基を表し、ここで、

$\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は独立して $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキル基を表し、

$\text{L}_1$ は第一の連結基または原子価結合を表し、

$\text{L}_2$ は第二の連結基または原子価結合を表し、

$\text{X}$ は水素原子、官能基、保護された官能基またはリガンドを表し、

$p$ は2～12の整数であり、

$n$ は10以上、好ましくは、20～1,000の整数である]で表されるポリマーの1種または2種以上を、それらのA部を介して結合したバイオセンサー表面であって、

(b) ポリマーのそれぞれを、一般式(I)におけるAが $\text{HS}-$ であり、そして $-\text{L}_2-\text{X}$ が $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ であるポリマーに相当するポリマーとして、表面プラズモン共鳴(SPR)検出器の金薄膜製の検出チップ上に結合させ、SPR検出器により該表面上へのウシ血清アルブミンの吸着の程度を測定した場合の $\Delta\theta \times 10^{-4} [^\circ]$ 値が10、好ましくは5以下を示す、ことを特徴とする表面、提供される。

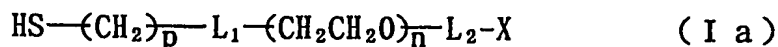
【0021】

さらに本発明によれば、上記のような表面の一部の作製方法であって、

(A) 一般式(Ia)

【0022】

【化14】



【0023】

(式中、 $L_1$ 、 $L_2$ 、 $X$ 、 $p$ および $n$ は上記一般式(I)について定義したのと同義である)

で表されるポリマーの水性溶液を金、銀、銅およびアルミニウムよりなる群から選ばれる金属表面と該ポリマーの所定量が該金属表面に結合するのに十分な条件下で接触させた後、未結合ポリマーを洗浄除去する工程、

(B) 次いで、前記工程で結合させたポリマーと同一のポリマーまたは異なるポリマーであって、 $n$ 数(すなわち、エチレンオキシド単位の数)が小さいポリマーの水性溶液を、(A)工程でもたらされた金属表面と、該表面に結合するのに十分な条件下で接触させた後、未結合ポリマーを洗浄除去する工程、ならびに

(C) こうして得られる表面に(B)工程と同様な複数の工程を行うこと、を含んでなる方法、も提供される。

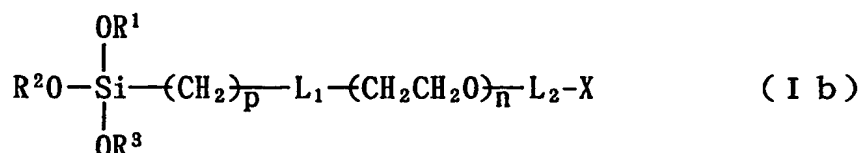
【0024】

さらなる発明として、上記表面の別の一部の作製方法であって、

(A) 一般式(Ib)

【0025】

【化15】



【0026】

(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $L_1$ 、 $L_2$ 、 $X$ 、 $p$ および $n$ は上記一般式(I)について定義したのと同様である)

で表されるポリマーの有機溶媒溶液をガラス、半導体、セラミックス、金属酸化物および合金酸化物よりなる群から選ばれる材料と該ポリマーの所定量が該材料表面に付着または結合するのに十分な条件下で接触させた後、溶媒を留去し、そして未結合ポリマーを洗浄除去する工程、

(B) 次いで、前記工程で結合させたポリマーと同一のポリマーまたは異なる

るポリマーであって、 $n$ 数（すなわち、エチレンオキシド単位の数）が小さいポリマーの有機溶媒溶液を、（A）工程でもたらされた材料表面と該表面に付着または結合するのに十分な条件下で接触させた後、溶媒を留去し、そして未結合ポリマーを洗浄除去する工程、ならびに

（C） こうして得られる表面に（B）工程と同様な複数の工程を行うこと、を含んでなる請求項1に記載の表面のうち、一般式（I）のAがトリアルコキシシリル基である表面の作製方法、も提供される。

#### 【0027】

また、別法として、一般式（I a）または（I b）における $n$ 数が少なくとも10、好ましくは20異なる2種以上のポリマー群の混合物を用いる、上記表面の作製方法も提供される。

#### 【0028】

##### 【発明の具体的な態様】

本発明の表面におけるBSAの吸着の程度を示す $\Delta\theta$  [°] は、例えば、Jung et al., Langmuir 1998, 14, 5636に記載されるとおり、金属界面での屈折率変化により誘起される値であり、大きな値はBSAの吸着量が多いことを示す。なお、この値は測定条件により変動する値であるが、本発明にいう $\Delta\theta$  [°] 値は、後述する「非特異的吸着試験」に従って測定される場合を前提とする。

#### 【0029】

また、本発明にいう、「ポリマーのそれぞれを一般式（I）におけるAがHS-であり、そして $-L_2-X$ が $-CH_2CH_2CH(OCH_2CH_3)_2$ であるポリマーに相当するポリマーとして」とは、一般式（I）におけるAの定義がHS-以外であり、そして $-L_2-X$ が $-CH_2CH_2CH(OCH_2CH_3)_3$ 以外であるポリマーを、假に、それぞれをHS-および $-CH_2CH_2CH(OCH_2CH_3)_2$ のポリマーとした場合の性状を想定するものである。

#### 【0030】

本発明に従う表面は、主としてSPRを応用したバイオセンサー表面について特に熟慮しているが、所謂、生物学的に特異的に非共有結合を形成する広く、リ



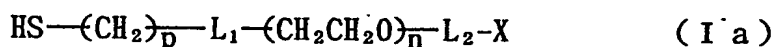
ガンドとレセプター、例えば、抗原もしくはハプテンと抗体、糖とレクチン、基質と酵素、ホルモンとその受容体、オリゴヌクレオチドとそれの相補鎖、のごとき結合対の形成を介して、表面に生じる何らかの変化がトレースできるバイオセンサー表面であればいかなるものであってもよい。トレースできるシグナルとしては、放射能、接触角、沈降、紫外分光、表面プラズモン共鳴等の変化であることができる。

【0031】

本発明に表面に用いることのできるポリマーは、殆どがそれ自体公知のものであり、AがHS-を表すポリマーについては、上記WO 01/86301に記載されており、一般式(Ia)

【0032】

【化16】



【0033】

(式中、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ 、X、 $p$ および $n$ は上記定義したとおりである)で表され、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ 、Xは、それぞれ製造方法によって、最適な基が選ばれ得る。 $\text{L}_1$ および $\text{L}_2$ は、独立して原子価結合または各種連結基であることができる。 $\text{L}_1$ の具体的な連結基としては、 $-\text{COO}-$ (酸素原子を介してエチレンオキシド単位に結合する)、 $-\text{O}-$ または $-\text{S}-$ が代表的なものである。 $\text{L}_2$ の具体的な連結基は、 $-(\text{CH}_2)_q-$ (ここで、 $q$ は2~6の整数である)である。

【0034】

Xは、水素原子、官能基、保護された官能基であり、官能基は、上記のリガンドを共有結合しうるいかなる基であってよい。リガンドがタンパク質またはヌクレオチドである場合を例にとれば官能基または保護された官能基としては、

【0035】

【化17】



【0036】

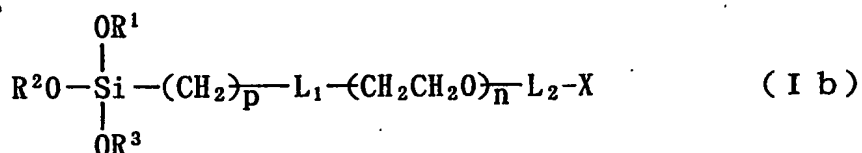
または $-COOH$ であり、 $R^b$ は独立して水素原子または $C_1-C_6$ アルキルを表し、 $R^c$ は独立して $C_1-C_6$ アルキルオキシ（ケタール）または2つの $R^c$ が一緒になってオキシ（上記基は、全体としてアルデヒド基： $-CHO$ となる）であることができ、あるいは $R^c$ は、 $C_1-C_6$ アルキルで置換されていてもよいエチレン基（環状ケタールを形成する）であることができる。特に、アルデヒド基または保護されたアルデヒド基（ケタール基）が、都合よく使用できる。 $C_1-C_6$ アルキルは、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、 $i$ so-プロピル、 $n$ -ブチル、 $sec$ -ブチル、 $n$ -ヘキシル等であるが、メチルであることが好ましい。

【0037】

Aがトリアルコキシシリル基である場合の一般式（I b）：

【0038】

【化18】



【0039】

（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $L_1$ 、 $L_2$ 、 $X$ 、 $p$ および $n$ は上記定義したとおりである）

で表されるポリマーも、殆どがそれ自体公知である。

【0040】

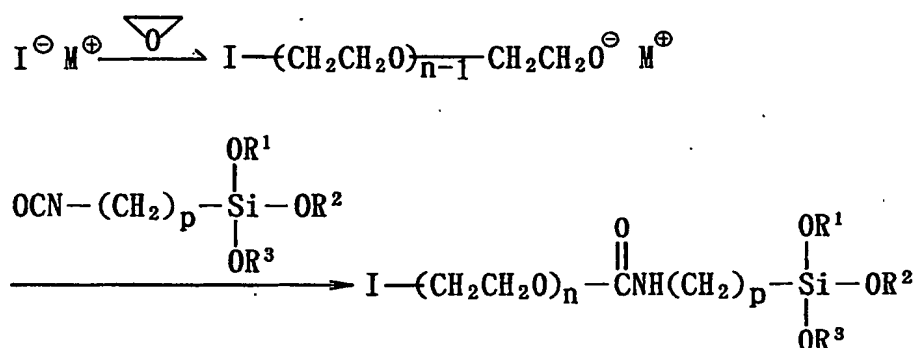
具体的には、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ について定義する $C_1-C_6$ アルキルは、 $R^b$ および $R^c$ について定義した $C_1-C_6$ アルキルと同じ意味を有する。一般式（I b）においても、 $-X$ は、上記一般式（I a）と同義であることができるが、 $L_1$

は、例えば、 $-O-$ 、 $-NHCOO-$ （酸素原子を介してエチレンオキシド単位に結合する）または $-N(R^d)-$ （ $R^d$ は $C_1-C_6$ アルキルである）であり、 $L_2$ は $-(CH_2)_\gamma-$ または $-CO(CH_2)_\gamma-$ （ $\gamma$ は2～6の整数である）である。かようなポリマーは、例えば、以下の反応スキームにより都合よく製造することができる。

反応スキーム1：

【0041】

【化19】

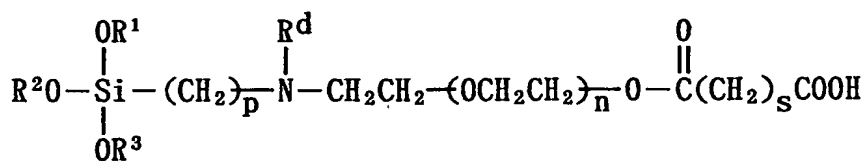
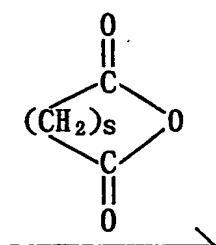
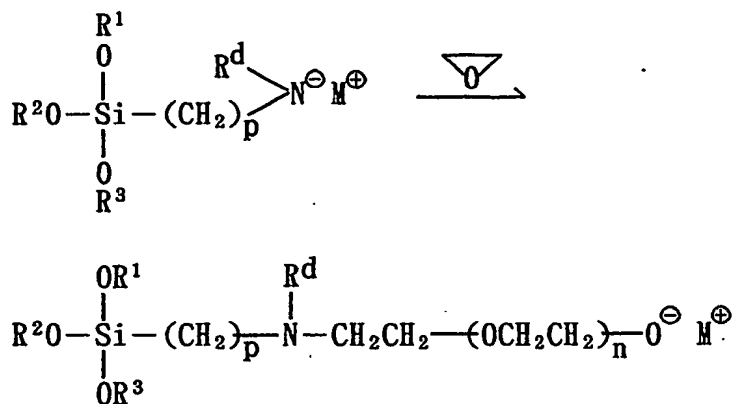


【0042】

反応スキーム2：

【0043】

【化 20】

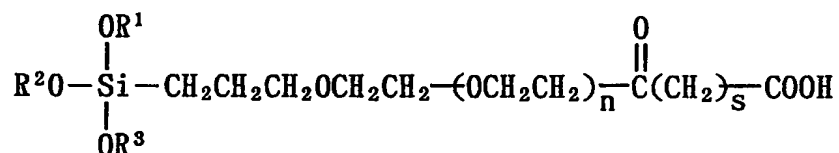
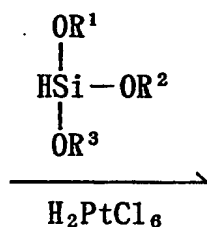
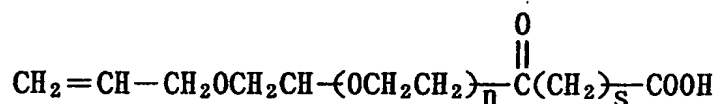
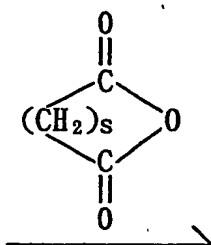
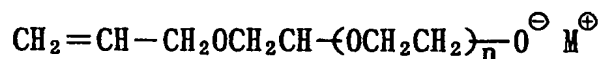
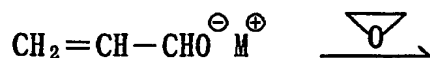


【0044】

反応スキーム 3 :

【0045】

【化 2 1】



【 0 0 4 6 】

(以上の各式中の略号は、Mはカリウム、ナトリウム、リチウムを表す。)

以上のリビング重合工程は、それ自体公知の反応条件の下で実施できる（例えば、WO 96/32434、WO 97/06202、等を参照されたい。）。  
その他は、後述する実施例に従い、または記載されている条件を改変して実施できる。

【 0 0 4 7 】

以上のポリマーを用いる表面の形成は、限定されるものでないが、一般式（I a）のポリマーを用いる場合は、表面の支持体（SPRセンサーでは、金属薄膜

）は、金、銀、銅およびアルミニウム等の金属から選ぶのがよい。他方、一般式（I b）のポリマーを用いる場合は、支持体は、ガラス、半導体、セラミック、金属酸化物および合金酸化物で、湿分等により、表面にヒドロキシル基を形成し、トリアルコキシシランと共有結合を形成するものから選ぶのがよい。

#### 【0048】

本発明に従う表面は、上記一般式（I a）または（I b）のポリマーが、それらを含む溶液を用いて、複数回の結合処理を行うか、またはエチレンオキシド単位の大きさの異なる2種以上のポリマーを含む溶液を用いる結合処理を行うことにより、ほぼ同一のポリマーの一度の結合処理ではほぼ一定の飽和結合基となるのにもかかわらず、かかる一度の処理による結合量に比べ有意に結合量の増加した状態となっている。一般式（I a）のポリマーを用いる場合は、適当な緩衝化した水溶液にポリマーを溶解し、こうして得られたポリマー溶液を適当な温度、例えば周囲温度（20～37℃）で支持体表面と接触させる。ポリマー溶液は用いるポリマーの分子量により、最適濃度が異なるが、通常、0.1～5 mg/ml、好ましくは1 mg/ml濃度として、接触はポリマー溶液と支持体表面とを接触させておき数10分から～数時間インキュベートすることによって行う。

#### 【0049】

こうして、ポリマーの一定量が支持体表面に結合（おそらく、化学結合）する。こうして得られる表面を洗浄することにより未結合のポリマー等を表面から洗浄除去する。洗浄は、未結合のポリマーを効率よく除去できるものであればいかなる洗液でもよいが、希薄NaOH水溶液を用いるのがよい。こうして洗浄が終了した後、得られた表面に、改めて、ポリマー溶液を用いるポリマーの再度の結合処理を行う。この再度の結合処理は、最初の結合処理および洗浄処理と実質的に同一であってもよい。好ましくは、この再度の結合処理および洗浄処理はさらに、1回以上行うことが好ましい。この各再度の結合処理に用いるポリマーは、最初の処理に用いたものと同一であることができるが、ポリ（エチレンオキシド）ブロックの分子量が最初のものと、それぞれ異なってもよい。異なる場合は、好ましくは、再度の結合処理に用いるポリマーの方が最初の結合処理に用い

るものより、分子量が小さくなるように選ぶのがよい。各再度の結合処理ごとに、徐々に分子量が小さくなるように選ぶこともできる。限定されるものでないがポリ（エチレンオキシ）ブロックの分子量を基準に、最初の結合処理と再度の結合処理とにそれぞれ用いるのに好ましい組み合わせとしては、一般式（I）または（I a）の  $n$  が 50～1000 のいずれかの整数であるポリマーで最初の結合処理を行い、各再度の結合処理を、該  $n$  が 10～60、好ましくは 20～60 のいずれかの整数であるポリマーを用いて行うことが好ましい。

#### 【0050】

一般式（I a）のポリマーに代え、一般式（I b）のポリマーを用いる場合には、ポリマーは、好ましくは無水の有機溶媒（例えば、トルエン等のポリマー易溶性有機溶媒）に溶解した溶液を用い、例えば、ガラス、チタン、アルミニウム等の表面へのポリマーの結合または付着処理を行った後、溶媒を留去した後、表面に対して未反応のポリマーを該有機溶媒を用いて洗浄除去することの他は、一般式（I a）のポリマーを用いる場合と同様に処理することにより、目的の表面を形成できる。

#### 【0051】

こうして形成された表面は、1回のポリマーの結合処理で得られる表面に比べ、より高密度なポリエチレングリコール（またはポリ（エチレンオキシド））の高分子ブラシが構築できバイオセンサー表面へ非特異的吸着を起こす試料中の夾雑タンパク質の吸着を著しく低下させることができる。さらには、より精密な生体分子間特異的相互作用の検出を可能にするであろう。

#### 【0052】

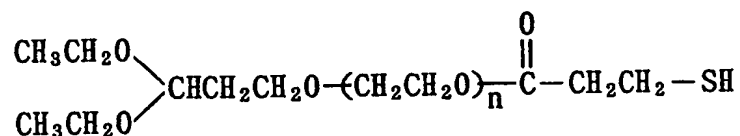
##### 【実施例】

以下、具体例を参照しながら本発明をさらに詳細に説明するが、これらの例に本発明を限定することを意図するものでない。

ポリマーの製造例：アセタール-PEG-SH ( $M_n = 2000, 5000$ ) の合成

#### 【0053】

【化 2 2】



【0054】

アルゴン置換した受器中に蒸留テトラヒドロフラン (THF) 20 ml と開始剤 3,3-ジエトキシ-1-プロパノール 0.2 mmol (0.032 ml) を加え、さらに当量のカリウムナフタレンを加えて15分攪拌することでメタル化を行った。その後、エチレンオキシド 22.7 mmol (1.135 ml) を加え、室温で2日間攪拌し重合させた。停止剤としてN-スクシンイミゾル-3-(2-ピリジルチオ) プロピオネート (SPDP) 0.4 mmol (0.125 g) を少量の蒸留THFに溶解させ、この溶液に対し前記の重合反応溶液を等圧滴下漏斗にて氷冷下で滴下した。一晚攪拌して停止反応を行った後に、飽和食塩水洗浄・クロロホルム抽出、エーテル再洗、ベンゼン凍結乾燥を経て、ポリマーを回収した。回収したポリマーは<sup>1</sup>H-NMRにて構造を確認し、末端に導入されたSPDP残基の量は、2-メルカプトエタノールと反応させることによって遊離した2-チオピリドンのUV吸収によっても確認した。

【0055】

PEG-SS-Py  $2.0 \times 10^{-2}$  mmol (100 mg) を蒸留水 4 ml に溶解させ、さらに5倍mol量のジチオトレイトール 0.1 mmol (15.42 mg) を加え、室温で30分攪拌した。反応後、飽和食塩水洗浄・クロロホルム抽出・エーテル再洗を経てPEG部のMn=5000のポリマー（以下、PEG 5000と略記する）を回収した。回収したポリマーは<sup>1</sup>H-NMRによって構造を確認し、さらに2-ピリジルジスルフィド (2-PDS) との反応により、末端SH基の定量を行った。

【0056】

さらに、上記エチレンオキシドの仕込み量を、減少させたこと以外、実質的に上記の操作を繰り返し、PEG部のMn=2000のポリマーを得た。このポリ



マーを、以下、PEG2000と略記する。なお、Mn値はPEGセグメントの分子量を表す。

#### 例1～8：J1センサーチップ上へのPEGの固定化

上記製造例に従って得られる各ポリマーの1.0mg/ml濃度溶液（溶媒：1M NaCl含有50mM PBS（pH7.3））を37℃下で、流速20μl/分により20分間J1センサーチップ（BIACOREから入手）の金表面に流した。その後、表面を50mM NaOH溶液で流速20μl/分により30秒間2回洗浄した。この一連の操作を固定化実験一回とし、それぞれ、以下に示す概要でポリマーの固定化を行い、各表面を得た。

例1（参考）：PEG5000(1)・・・PEG5000を金表面に固定化。固定化実験回数は1回。

【0057】

カッコは回数表示。

例2（参考）：PEG2000(1)・・・PEG2000を金表面に固定化。固定化実験回数は1回。

例3（本発明）：PEG5000(1)+PEG2000(1)・・・PEG5000を金表面に1回固定化。その後、PEG2000を金表面に1回固定化。

例4（本発明）：PEG5000(1)+PEG2000(3)・・・PEG5000を金表面に1回固定化。その後、PEG2000を金表面に3回固定化。

例5（本発明）：PEG5000(1)+PEG2000(5)・・・PEG5000を金表面に1回固定化。その後、PEG2000を金表面に5回固定化。

例6（本発明）：PEG5000 および PEG2000(1)・・・PEG5000 および PEG2000の混合物溶液を金表面に1回固定化。

例7（本発明）：PEG5000(4)・・・PEG5000を金表面に固定化。固定化実験回数は4回。

例8（本発明）：PEG5000(4)+PEG2000(3)・・・PEG5000を金表面に4回固定化。その後、PEG2000を金表面に3回固定化。

#### 例：非特異的吸着試験

例1～8で得たJ1センサーチップ、未処理CM5（カルボキシメチルデキストラン（BIACOREより入手）をJ1センサーチップに吸着した）およびブロックCM5（カルボキシメチル基をブロッキングした）の各表面に1mg/m

1 濃度のウシ血清アルブミン (BSA) 溶液 [溶媒: 0.15M NaCl 含有 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) + 3 mM EDTA および 0.005% (v/v) サーフアクタント P20] を 25℃ で、流速 20  $\mu$ l / 分にて 10 分間流した。

## 【0058】

BSA 溶液注入終了 3 分後の表面への BSA の結合量を各表面において測定した。なお、未処理 CM5 は市販のままの状態 で用いたものである。他方、ブロック CM5 は、① NHS / EDC 混合溶液を 10  $\mu$ l / 分の流速で未処理 CM5 表面に 10 分間流し、次いで② エタノールアミン溶液を 10  $\mu$ l / 分の流速で 10 分間流し、最後に 50 mM NaOH 溶液を 10  $\mu$ l / 分の流速で 1 分間流す洗浄を 3 回行ってカルボキシメチル基をブロックしたものである。結果を図 1 に示す。

## 【0059】

図 1 より、本発明に従う表面は、BSA の吸着量は、市販の未処理 CM5 およびブロック CM5、さらには例 1 (参考) および例 2 (参考) に比べて著しく低下していることがわかる。

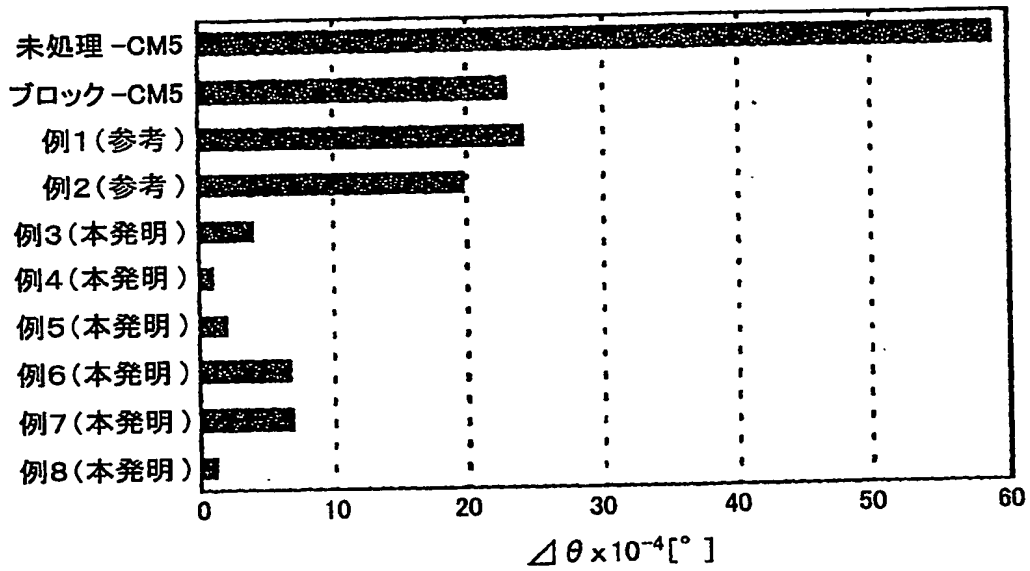
## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

各表面に対する BSA の吸着試験の結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】.



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 非特異的吸着の低下したセンサー表面の提供

【解決手段】

センサー表面に対する結合性部位を有するポリ（エチレンオキシド）を主体とするポリマー溶液をバイオセンサー表面へ複数回接触結合させることにより得ることのできるタンパク質（例えば、BSA）の吸着が著しく低下した表面

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成14年 6月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

    【出願番号】 特願2002- 65298

【承継人】

    【識別番号】 899000024

    【氏名又は名称】 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

【承継人代理人】

    【識別番号】 100060782

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小田島 平吉

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 019666

    【納付金額】 4,200円

【その他】 譲渡証書及び委任状は同日付手続補足書にて提出。

【プルーフの要否】 要

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-065298
受付番号	50200892956
書類名	出願人名義変更届
担当官	北原 良子 2413
作成日	平成14年 8月 1日

### <認定情報・付加情報>

#### 【承継人】

【識別番号】	899000024
【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸の内 ビルディング6階
【氏名又は名称】	株式会社 先端科学技術インキュベーションセン ター

#### 【承継人代理人】

【識別番号】	申請人 100060782
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1-9-15 日本自転車会館内
【氏名又は名称】	小田島 平吉

次頁無

【書類名】	手続補足書
【提出日】	平成14年 6月19日
【あて先】	特許庁長官 及川 耕造 殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2002- 65298
【補足をする者】	
【識別番号】	899000024
【氏名又は名称】	株式会社先端科学技術インキュベーションセンター
【代理人】	
【識別番号】	100060782
【弁理士】	
【氏名又は名称】	小田島 平吉
【補足対象書類名】	出願人名義変更届
【補足の内容】	譲渡証書及び委任状
【提出物件の目録】	
【物件名】	譲渡証書   1
【物件名】	委任状     1

(A)10201140027



譲渡証書

平成14年3月11日

(譲受人)

住 所 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号  
新丸の内ビルディング6階

名 称 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター 殿

(譲渡人)

住 所 東京都中野区上鷺宮5-17-22

氏 名 片岡 一則



下記の発明に関する特許を受ける権利を貴社に譲渡したことに相違  
ありません。

記

- 1 特許出願の番号 特願2002-065298
- 2 発明の名称 増大した密度のポリ(エチレンオキシド)のブ  
ラシ様構造表面



委任状

平成14年3月11日

(A)10201140027  
10201140027

私（私ども）は、

識別番号100060782（弁理士） 小田島 平吉 氏

識別番号100094293（弁理士） 藤 井 幸喜 氏

を以て代理人として下記事項を委任します。



1. 特願2002-065298

に関する手続

1.

に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ

1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ

1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求

1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求

1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄

1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続

1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続

1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求

1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続

1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ

1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと

1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所（居所） 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号

新丸の内ビルディング6階

氏名（名称） 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

代表者 山 本 貴 史



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-065298
受付番号	10201140027
書類名	手続補足書
担当官	北原 良子 2413
作成日	平成14年 7月30日

### <認定情報・付加情報>

#### 【補足をする者】

##### 【識別番号】

899000024

##### 【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸の内  
ビルディング6階

##### 【氏名又は名称】

株式会社 先端科学技術インキュベーションセン  
ター

#### 【代理人】

申請人

##### 【識別番号】

100060782

##### 【住所又は居所】

東京都港区赤坂1-9-15 日本自転車会館内

##### 【氏名又は名称】

小田島 平吉

#### 【提出された物件の記事】

##### 【提出物件名】

委任状（代理権を証明する書面）	1
譲渡証書	1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500213982]

1. 変更年月日

2000年 5月11日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中野区上鷺宮5-17-22

氏 名

片岡 一則

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[899000024]

1. 変更年月日 1999年 9月16日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸の内ビルディング6階

氏 名 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター